Leticia Maciel de Souza

1 –Defina eletroforese capilar.

A **eletroforese capilar (EC)** é uma técnica analítica de separação que utiliza um campo elétrico para separar componentes iônicos (moléculas carregadas) de uma amostra em um capilar estreito. A separação ocorre devido às diferenças nas velocidades de migração dos íons, que são influenciadas pela razão carga/massa dos analitos e pelo fluxo eletrosmótico (EOF). É reconhecida por sua **alta eficiência e resolução**, capacidade de analisar **pequenos volumes de amostra** (na ordem de nanolitros) e por ser **rapidamente automatizada**.

2 –Explique o que é o fluxo eletrosmótico e porque ele ocorre.

O **fluxo eletrosmótico (EOF)** é o movimento global e uniforme da massa de solvente (tampão) dentro do capilar durante a eletroforese capilar, induzido pela aplicação de um campo elétrico.

Mecanismo de Ocorrência:

1. **Carga da Parede do Capilar**: Em pHs acima de 3, a parede interna de um capilar de sílica fundida (o material mais comum) apresenta carga negativa devido à ionização dos grupos silanol (Si-OH) em sua superfície ($Si\text{-}O^-$).
2. **Formação da Dupla Camada Elétrica**: Essa carga negativa na parede atrai cátions do tampão, formando uma "dupla camada elétrica" adjacente à superfície interna do capilar.
3. **Movimento dos Cátions e Arraste do Solvente**: Quando um campo elétrico é aplicado, os cátions móveis na camada externa difusa dessa dupla camada são arrastados em direção ao cátodo (polo negativo). Por atrito viscoso, esses cátions arrastam consigo a massa de solvente (o tampão), criando um fluxo unidirecional em direção ao cátodo.
4. **Perfil de Fluxo**: Ao contrário do fluxo laminar gerado por pressão (que tem um perfil parabólico), o EOF apresenta um **perfil de fluxo plano** (tipo "pistão"). Este perfil uniforme é crucial para a alta eficiência de separação na eletroforese capilar, pois minimiza o alargamento hidrodinâmico das bandas.

Em geral, a velocidade do fluxo eletrosmótico é maior do que a velocidade de migração eletroforética dos íons individuais e, na prática, atua como o mecanismo de bombeamento da fase móvel na eletroforese capilar.

3 –Em relação ao sinal analítico, qual é o perfil esperado para um esferograma? Justifique sua resposta.

Em um **eletroferograma**, o perfil esperado para os picos dos analitos separados é de **picos estreitos, bem resolvidos e simétricos**, com formato que se aproxima ao gaussiano.

Justificativa:

- **Perfil de Fluxo Plano do EOF**: O fluxo eletrosmótico move a massa de solvente de forma uniforme em todo o diâmetro do capilar. Isso significa que as moléculas de analito, independentemente de estarem próximas à parede ou no centro do

capilar, se movem aproximadamente com a mesma velocidade de fluxo do tampão.

- **Minimização do Alargamento Hidrodinâmico**: O perfil de fluxo plano do EOF minimiza o alargamento hidrodinâmico das bandas de analito, que é uma fonte significativa de alargamento de banda na cromatografia líquida, por exemplo (onde o fluxo é parabólico).
- **Difusão Longitudinal**: Na eletroforese capilar, sendo uma técnica de fase única, a principal fonte de alargamento de banda é a difusão longitudinal. No entanto, devido aos altos campos elétricos e capilares estreitos, a contribuição da difusão é muitas vezes minimizada, resultando em picos muito estreitos e eficientes.

A combinação desses fatores permite que os componentes da amostra se movam como bandas compactas e bem definidas, resultando em picos de alta resolução no eletroferograma.

4 –Quais as modalidades de eletroforese capilar?

Eletroforese Capilar por Zona (CZE):

- **Princípio**: A composição da solução tamponada é constante em toda a zona de separação. A separação ocorre baseada nas diferenças de mobilidade eletroforética dos íons (razão carga/massa) em um campo elétrico. Íons mais rápidos migram primeiro, seguidos por neutros (que migram com o EOF) e, por fim, íons mais lentos.
- **Exemplo de Aplicação**: Separação de íons inorgânicos pequenos, herbicidas sintéticos, pesticidas e fármacos.

Eletroforese Capilar em Gel (CGE):

- **Princípio**: O capilar é preenchido com uma matriz polimérica (gel poroso) que atua como uma "peneira molecular". A separação ocorre principalmente pelo tamanho molecular, com moléculas menores migrando mais rapidamente através da rede do gel.
- **Exemplo de Aplicação**: Separação de macromoléculas, como proteínas, fragmentos de DNA, oligonucleotídeos e, especialmente, sequenciamento de DNA

Isotacoforesis Capilar (CITP):

- **Princípio**: A amostra é injetada entre dois tampões (um "líder" com íons de alta mobilidade e um "finalizador" com íons de baixa mobilidade). Os íons do analito migram em bandas adjacentes e todas as bandas acabam se movendo na mesma velocidade, mas com diferentes concentrações e intensidades de campo elétrico em cada banda, resultando em um "empilhamento" das bandas.
- **Característica**: Ao contrário de CZE, as bandas do analito são adjacentes e não separadas por tampão.
- **Exemplo de Aplicação:** Detecção de traços de fármacos ou metabólitos em fluidos biológicos (urina, plasma), onde se busca aumentar a sensibilidade de detecção de componentes minoritários.

Focalização Isoelétrica Capilar (CIEF):

- **Princípio**: Utilizada para separar espécies anfóteras (como aminoácidos e proteínas) com base em seus pontos isoelétricos (pI). Um gradiente de pH contínuo é estabelecido ao longo do capilar usando anfolitos. Os analitos migram até a região onde o pH é igual ao seu ponto isoelétrico (pI), tornando-se neutros e parando a migração.
- **Característica**: A separação se baseia nas propriedades de equilíbrio dos analitos e não na mobilidade. As bandas são "focalizadas" em seu pI.
- **Exemplo de aplicação**: Caracterização de isoformas de proteínas e verificação de homogeneidade de produtos biofarmacêuticos, distinguindo variações mínimas de pI.

Cromatografia Micelar Eletrocinética (MEKC):

- **Princípio**: Uma modificação da CE que permite a separação de espécies neutras e carregadas. Micelas (agregados de surfactantes) são adicionadas ao tampão acima da concentração micelar crítica (CMC). Essas micelas atuam como uma fase pseudoestacionária e os analitos se particionam entre a fase aquosa e o interior hidrofóbico das micelas. O EOF arrasta as micelas (e os analitos nelas particionados) em direção a um dos eletrodos, permitindo a separação.
- **Exemplo de Aplicação**: Separação de fenóis, nitroderivados aromáticos de baixa massa molecular e, separações quirais.

5 –Cite duas fontes de alargamento de banda na eletroforese capilar e comente como esse problema pode ser minimizado.

Na eletroforese capilar, o alargamento de banda (que reduz a eficiência da separação) pode ser causado por vários fatores. Duas fontes principais e como minimizá-las são:

1. **Aquecimento Joule**:

Descrição: É o calor gerado pela passagem de corrente elétrica através do tampão resistivo dentro do capilar. Esse calor cria gradientes radiais de temperatura (o centro do capilar fica mais quente que as paredes), o que, por sua vez, gera gradientes de viscosidade e mobilidade eletroforética. Como resultado, as moléculas no centro migram mais rapidamente do que as próximas à parede, causando o alargamento da banda.

Minimização:

- **Redução do diâmetro interno do capilar**: Capilares com diâmetros menores (por exemplo, 25-50 μm) dissipam o calor mais eficientemente devido à maior relação superfície/volume.
- **Uso de tampões de baixa condutividade**: Tampões com menor força iônica ou concentração geram menos corrente e, consequentemente, menos calor.
- **Refrigeração eficaz do capilar**: Sistemas de refrigeração forçada (ar ou líquido) ajudam a manter a temperatura uniforme ao longo do capilar.
- **Uso de voltagens mais baixas**: Diminuir a voltagem aplicada reduz a corrente e o aquecimento Joule, embora possa aumentar o tempo de análise.

2. **Adsorção do Analito à Parede do Capilar**:

Descrição: As moléculas do analito, especialmente proteínas e outras espécies polares ou carregadas, podem interagir e adsorver-se à superfície interna do capilar (que é negativamente carregada em capilares de sílica fundida). Essa adsorção retarda a

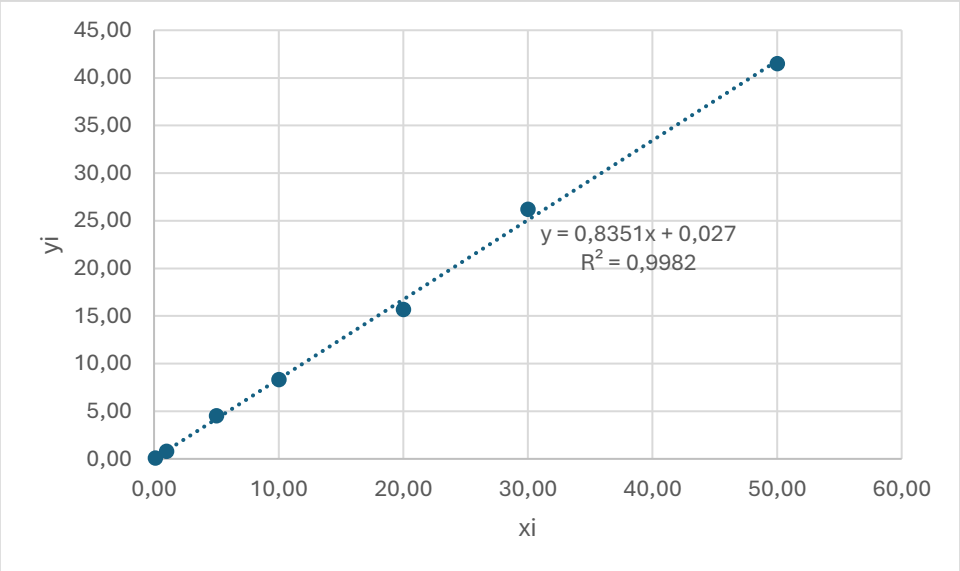
migração de parte do analito de forma não uniforme e pode levar a picos com cauda (tailing), alargamento ou até perda de analito.

Minimização:

- **Modificação da superfície do capilar**: Revestir a parede interna do capilar com polímeros neutros (como poliacrilamida ou metilcelulose) para mascarar os grupos silanol carregados e tornar a superfície mais hidrofílica e inerte ao analito.
- **Ajuste do pH do tampão**: Modificar o pH para alterar a carga do analito ou da superfície do capilar, minimizando as interações. Por exemplo, em pHs muito baixos, os grupos silanol são protonados e perdem a carga negativa.
- **Adição de aditivos ao tampão**: Incluir aditivos como surfactantes (que formam uma camada na parede) ou agentes complexantes que competem com o analito pelos sítios de adsorção na parede.

6 –Fazer o exercício 30.12 do Livro: Princípios de Análise Instrumental, 6ª Edição. Letras: a, d.

a) Deduzir a equação da curva de calibração e o desvio padrão da inclinação e da interseção com o eixo y. Determinar o valor de R



xi(nM)	yi(Área)	xi^2	yi^2	xi.yi
0,10	0,10	0,01	0,01	0,01
1,00	0,80	1,00	0,64	0,80
5,00	4,52	25,00	20,43	22,60
10,00	8,32	100,00	69,22	83,20
20,00	15,70	400,00	246,49	314,00
30,00	26,20	900,00	686,44	786,00
50,00	41,50	2500,00	1722,25	2075,00
∑xi= 116,10	∑yi = 97,14	$\sum xi^2$ = 3926,01	$\sum yi^2$= 2745,48	∑xi.yi = 3281,61

Sendo a Equação Genérica y=mx +b, logo:

A **inclinação (coeficiente angular)** é m = 0,8351

A **interceptação (coeficiente linear)** é b = 0,027

Desvio Padrão da Regressão: N = Número de pontos de calibração

Sxx = $\sum xi^2 - \frac{\sum(xi^2)}{N} = 3926,01 - \frac{116,10^2}{7} = 2000,4086$

Syy = $\sum yi^2 - \frac{\sum(yi)^2}{N} = 2745,48 - \frac{97,14^2}{7} = 1397,4544$

Sxy = $\sum xiyi - \frac{\sum(xi)\sum(yi)}{N} = 3281,61 - \frac{(116,10)(97,14)}{7} = 1670,5337$

Dp = $\sqrt{\frac{Syy - mSxy}{N-2}} = \sqrt{\frac{1397,4544 - (0,8351)(1670,5337)}{7-2}} = 0,6955$

Desvio Padrão da Inclinação

Dic = $\frac{Dp}{\sqrt{Sxx}} = \frac{0,6955}{\sqrt{2000,4086}} = 0,0155$

Desvio Padrão da Interceptação

Dip = Dp$\sqrt{\frac{\sum xi^2}{NSxx}} = 0,6955\sqrt{\frac{3926,01}{7(2000,4086)}} = 0,3688$

d) Duas amostras de concentração desconhecida de DOX injetadas dão áreas de pico de 11.3 e 6.97. Quais são as concentrações e seus desvios padrão? (Assumindo M=1 para cada medição da amostra desconhecida). y=mx +b; x= y-b/m

Dpc = $\frac{Dp}{m}\sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(y-ym)^2}{m^2 Sxx}}$

xm = $\frac{116,10}{7} = 16,5857$; ym = $\frac{1197,14}{7} = 13,8771$ xc = $\frac{11,3-0,027}{0,8351} = 13,4989$

Dpc = $\frac{0,6955}{0,8351}\sqrt{\frac{1}{1} + \frac{1}{7} + \frac{(11,3-13,8771)^2}{0,8351^2(2000,4086)}} =$ 0,892nm

Concentração amostra 1 = 13,50 (±0,89) nM

xc = $\frac{6,97-0,027}{0,8351} = 8,3139$

Dpc = $\frac{0,6955}{0,8351}\sqrt{\frac{1}{1} + \frac{1}{7} + \frac{(6,97-13,8771)^2}{0,8351^2(2000,4086)}} =$ 0,903nm

Concentração amostra 2 = 8,31 (±0,90) nM

ESTUDOS DE CASO

1 – Separação de macromoléculas com diferentes massas moleculares. Considerar moléculas de 100 a 500 Daltons.

2 – Separação de macromoléculas e fragmentos de macromoléculas com diferentes cargas elétricas.

3 – Descrição de um equipamento de eletroforese capilar, com todos os seus componentes.

1. Separação de macromoléculas com diferentes massas moleculares (100 a 500 Daltons)

Para a separação de macromoléculas baseada principalmente em suas massas moleculares, a técnica mais indicada é a Eletroforese Capilar em Gel (ECG). A ECG é ideal para este propósito porque incorpora uma matriz polimérica porosa (gel) dentro do capilar. Esta matriz age como uma peneira molecular, conforme as moléculas se movem através do campo elétrico, elas são retardadas de forma diferente pela rede de poros do gel, dependendo do seu tamanho hidrodinâmico (e, consequentemente, massa molecular). Isso significa que, mesmo que as moléculas na faixa de 100 a 500 Daltons possuam cargas elétricas semelhantes, o gel permite que a separação ocorra com base em suas diferenças de tamanho. Moléculas menores conseguem navegar pelos poros do gel mais rapidamente do que as maiores, resultando em diferentes tempos de migração e, portanto, separação.

2. Separação de macromoléculas com diferentes cargas elétricas

Para a separação de macromoléculas e fragmentos de macromoléculas baseada principalmente em suas diferentes cargas elétricas, a técnica mais indicada é a Eletroforese Capilar de Zona (ECZ). A ECZ é a modalidade mais fundamental e amplamente utilizada de eletroforese capilar, projetada especificamente para explorar as diferenças de mobilidade eletroforética das espécies iônicas em um campo elétrico. A mobilidade eletroforética de um íon é diretamente proporcional à sua carga elétrica e inversamente proporcional ao seu tamanho hidrodinâmico e à viscosidade do meio. Portanto, se as macromoléculas e seus fragmentos possuem diferentes cargas elétricas (e/ou diferentes relações carga-para-tamanho), a ECZ irá separá-los eficientemente. As espécies com maior carga (ou maior relação carga-para-tamanho) migrarão mais rapidamente em direção ao eletrodo de polaridade oposta, enquanto as com menor carga (ou menor relação carga-para-tamanho) migrarão mais lentamente.

3- Descrição de um equipamento de eletroforese capilar, com todos os seus componentes.

O SeqStudio™ Flex Series Genetic Analyzer (especificamente o modelo de 24 capilares, Cat. No. A50370) é um **instrumento de análise de DNA baseado em fluorescência**, que utiliza a **tecnologia de eletroforese capilar**. Ele é projetado para aplicações de sequenciamento de DNA e análise de fragmentos (incluindo Human Identification - HID). Embora seja um instrumento de uso geral para pesquisa (Research Use Only - RUO) para fins diferentes de identificação humana, seu design e funcionalidade visam alta precisão e eficiência.

Componentes Principais e suas Funções:
O instrumento é composto por diversas partes essenciais, que podem ser divididas em externas e internas, além das conexões.

I. Componentes Externos (Visão Geral do Instrumento)
Conforme a *Figura 1: Partes do instrumento* no manual, os componentes externos e suas funções são:

1. **Compartimento da Bomba:** Contém elementos cruciais para a entrega de polímero e tampão.
2. **Microfones:** Utilizados para comandos de voz, integrados com a funcionalidade Alexa™.
3. **Botão Liga/Desliga (On/Off):** Para controle de energia do painel frontal (o disjuntor na parte traseira é para operação menos comum).
4. **Sensor de Proximidade:** Ativa funções como comandos de voz quando detecta a presença de um usuário.
5. **Alto-falantes:** Para feedback de áudio, incluindo comandos de voz e vídeos instrutivos.
6. **Compartimento da Gaveta:** Onde as placas de amostra são carregadas. Pode acomodar até quatro placas.
7. **Portas USB:** Para transferência de dados e conexão de acessórios, como leitores de código de barras USB.
8. **Tela Sensível ao Toque (Touchscreen):** A interface principal para interação com o software do instrumento, permitindo ações de toque e deslize.
9. **LED Azul:** Indicador de operação normal do instrumento. Pisca em âmbar se houver um problema.
10. **Compartimento do Capilar, Célula de Detecção, Aquecedor da Célula de Detecção e Compartimento do Forno:** A área onde ocorre a separação eletroforética e a detecção fluorescente.

II. Componentes Internos

A. Compartimento da Bomba e Soluções (visível ao abrir a porta do instrumento):

1. **Bomba de Entrega de Polímero (PDP - Polymer Delivery Pump):** Bombeia o polímero para o array capilar e executa procedimentos de manutenção automatizados. Inclui:

- Câmara da bomba de deslocamento.
- Câmaras de polímero.
- Vedação de água do pistão.
- Porta do array capilar.
- Conector da válvula de retenção.
- Recipiente de resíduos do coletor de água.
- Válvula de tampão.
- Eletrodo de ânodo.
- Junta de vedação do tampão.

2. **Recipiente de Resíduos do Coletor de Água (Water Trap Waste Container):** Coleta resíduos de água do sistema da bomba.
3. **Recipiente de Tampão do Ânodo (ABC - Anode Buffer Container):** Contém tampão de corrida 1X para todas as aplicações de eletroforese. Possui uma câmara de transbordo embutida para manter a altura constante do fluido.
4. **Bolsa de Polímero ou Bolsa de Reagente de Condicionamento (Polymer or Conditioning Pouch):**
   - **Bolsa de Polímero:** Fornece o polímero para a bomba.
   - **Bolsa de Reagente de Condicionamento:** Usada para lavar a bomba de polímero e o array capilar durante a troca de tipo de polímero e durante o desligamento do instrumento.
5. **Recipiente de Tampão do Cátodo (CBC - Cathode Buffer Container):** Contém tampão de corrida 1X para todas as aplicações de eletroforese.
6. **Autosampler do CBC:** Mecanismo que movimenta o CBC para as posições de carregamento e lavagem dos capilares.

B. Compartimento do Array Capilar e Detecção:

1. **Array Capilar:** O coração do sistema de separação. Permite a separação de fragmentos de DNA marcados fluorescentemente por eletroforese. O modelo A50370 utiliza arrays de **24 capilares**. Disponível em diferentes comprimentos (ex: 36 cm ou 50 cm).
2. **Forno/Porta do Forno (Oven/Oven Door):** Mantém uma temperatura uniforme dentro do array capilar, crucial para a separação ótima.
3. **Célula de Detecção (Detection Cell):** Permite a detecção dos fragmentos de DNA marcados fluorescentemente. O laser direciona a luz para esta célula.
4. **Aquecedor da Célula de Detecção (Detection Cell Heater):** Mantém a temperatura uniforme da célula de detecção.
5. **Reservatório de Condensação do Forno (Oven Condensation Reservoir):** Coleta a condensação que pode se formar no forno.

C. Outros Componentes Internos/Integrados:

1. **Leitor Interno de Código de Barras (não mostrado nas figuras principais):** Escaneia os códigos de barras nas placas para suportar um fluxo de trabalho automatizado.
2. **Etiquetas de Identificação por Radiofrequência (RFID - Radio Frequency Identification Tags):** Localizadas nas etiquetas dos consumíveis primários do instrumento (ABC, Array Capilar, CBC, polímero POP™). Unidades de leitura/gravação RFID internas ao instrumento detectam e rastreiam informações como números de lote, números de série, datas de validade e capacidade de uso.

III. Conexões de Energia e Comunicação

A. Painel Frontal:

1. **Portas USB:** Usadas para transferência de dados (ex: via pen drive).

B. Painel Traseiro:

1. **Porta USB Recuada:** Para uso com o adaptador de rede sem fio (não mostrado).
2. **Porta USB:** Para conexão opcional de um scanner de código de barras USB.
3. **Porta de Conexão Direta:** Permite a conexão de um computador sem necessidade de rede.
4. **Porta de Rede Com Fio (Ethernet):** Para conexão à rede local (LAN).
5. **Disjuntor (Rear Power Switch):** Chave de energia traseira; o botão frontal é para operação normal.
6. **Tomada de Energia (Power Receptacle):** Para conectar o cabo de alimentação.